

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : A61K		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/13490
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. April 1997 (17.04.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/01878		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, HU, JP, KR, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 26. September 1996 (26.09.96)			
(30) Prioritätsdaten: 195 39 409.7 11. Oktober 1995 (11.10.95) DE		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTI- TUT FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH AN DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN [DE/DE]; Spandauer Damm 130, D-14050 Berlin (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LICH, Kai [DE/DE]; Argentinische Allee 179, D-14169 Berlin (DE). RIEFKE, Björn [DE/DE]; Weverstrasse 51, D-13595 Berlin (DE). WEITSCHIESS, Werner [DE/DE]; Gneisenaustasse 65, D-10961 Berlin (DE). HELDMANN, Dieter [DE/DE]; Krefelderstrasse 3, D-10555 Berlin (DE). SUDMANN, Violetta [DE/DE]; Badstrasse 64, D-13357 Berlin (DE).			
(74) Anwalt: WABLAT, Wolfgang; Potsdamer Chaussee 48, D- 14129 Berlin (DE).			
(54) Title: CONTRASTING AGENTS FOR NEAR INFRARED DIAGNOSIS			
(54) Bezeichnung: KONTRASTMITTEL FÜR DIE NAHINFRAROT-DIAGNOSTIK			
(57) Abstract			
Colloidal systems loaded with polymethine dyes having appropriate photophysical and pharmacological properties are disclosed, as well as their use as contrasting agents in fluorescence and transillumination diagnosis in the near infrared spectral range and a process for producing the same.			
(57) Zusammenfassung			
Die Erfindung betrifft mit Polymethinfarbstoffen beladene kolloidale Systeme mit geeigneten photophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften, deren Verwendung als Kontrastmittel in der Fluoreszenz- und Transilluminationsdiagnostik im nahinfraroten Spektralbereich sowie Verfahren zu ihrer Herstellung.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Kontrastmittel für die Nahinfrarot-Diagnostik

5 Die Erfindung betrifft mit Polymethinfarbstoffen beladene kolloidale Systeme, deren Verwendung als Kontrastmittel in der Nahinfrarot-Diagnostik sowie Verfahren zu ihrer Herstellung.

10 Da biologisches Gewebe eine relativ hohe Durchlässigkeit für langwelliges Licht des Wellenlängenbereiches von 700 bis 1000 nm besitzt, steht dem Diagnostiker hiermit neben den modernen bildgebenden Verfahren, wie Röntgen, die Magnetresonanztomographie oder die Ultraschalldiagnostik,
15 ein völlig anderes Verfahren zur bildlichen Gewebedarstellung zur Verfügung.

Dabei kann sowohl die Detektion der nicht absorbierten Strahlung in Form einer Transmissionsdarstellung als auch
20 die nach Bestrahlung mit nahinfrarotem Licht emittierte Fluoreszenzstrahlung gewebespezifische Informationen liefern.

Das wesentliche Problem bei der Nutzung von nahinfraroter
25 Strahlung ist die außerordentlich starke Streuung des Lichtes, so daß selbst bei unterschiedlichen photophysikalischen Eigenschaften von einem scharf begrenzten Objekt und seiner Umgebung sich dieses Objekt nur unscharf abzeichnet. Das Problem nimmt mit wachsender
30 Entfernung des Objektes von der Oberfläche zu und kann als hauptsächlicher limitierender Faktor sowohl bei der Transillumination als auch bei der Detektion von Fluoreszenzstrahlung angesehen werden.

35 Zur Verbesserung der Differenzierung zwischen normalem und erkranktem Gewebe können geeignete Fluoreszenzfarb-

stoffe beitragen, die sich im erkrankten Gewebe (insbesondere Tumoren) anreichern und ein spezifisches Absorptions- und Emissionsverhalten besitzen. Die durch Absorption des Farbstoffes bewirkte Änderung des
5 (gestreuten) eingestrahltten Lichtes oder die durch die Anregerstrahlung induzierte Fluoreszenz wird detektiert und liefert die eigentlichen gewebespezifischen Informationen.

10 Für die Lokalisation und Abbildung von Tumoren wurden bisher hauptsächlich die für eine Anwendung in der Photodynamischen Therapie (PDT) konzipierten Photosensibilisatoren, u. a. Porphyrine, Chlorine, Phthalocyanine, Naphthalocyanine, verwendet (Bonnett R.; New photosensitizers for the photodynamic therapy of tumours, SPIE Vol. 15 2078 (1994)). Verbindungen aus den aufgeführten Klassen haben den gemeinsamen Nachteil, daß sie im Wellenlängenbereich von 700 - 1000 nm nicht oder nur gering absorbieren. Die photosensibilisierende Wirkung dieser Farbstoffe
20 ist für ein reines, wirkungsfreies Diagnostikum unerwünscht. Darüber hinaus besitzen die aufgeführten Farbstoffe häufig eine geringe Photostabilität.

Im Gegensatz dazu besitzen Farbstoffe aus der Klasse der
25 Polymethine Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften, die durch hohe Absorptionskoeffizienten zwischen 700 und 1000 nm und hinreichende Fluoreszenzquantenausbeuten charakterisiert sind. Die photosensibilisierende Wirkung der Polymethine ist vernachlässigbar, die Photostabilität
30 überwiegend sehr hoch.

Durch die Überführung von Fluoreszenzfarbstoffen in kolloidale Systeme kann eine deutliche Veränderung in deren pharmakokinetischer Eigenschaften erzielt werden.
35 Hierdurch kann eine Gewebs- oder organspezifische bzw.

ortsspezifische Anreicherung derart formulierter
Fluoreszenzfarbstoffe erreicht werden.

5 Darüber hinaus ist zur Applikation in Form wäßriger
Lösungen eine große Hydrophilie der Farbstoffe
erforderlich, um für eine Bildgebung ausreichende Mengen
an Farbstoff in Form wäßriger Lösungen in den Körper
einbringen zu können.

10 Es ist bekannt, daß die Überführung der Farbstoffe in
kolloide Systeme zu einer Erhöhung der applizierbaren
Dosis führen kann.

15 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein
Kontrastmittel zur Verfügung zu stellen, welches sich in
hohem Maße in den zu untersuchenden Geweben anreichert
und dort unter Ausnutzung nahinfraroter Strahlung nachge-
wiesen werden kann.

20 Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch die Schaffung
von Kontrastmitteln gelöst, welche kolloidale, farbstoff-
beladene Systeme enthalten, wobei diese Kolloide einen
Größenbereich von 5 nm bis 10 µm aufweisen und mindestens
einen im Wellenlängenbereich von 600 bis 1200 nm absor-
25 bierenden und/oder fluoreszierenden Farbstoff enthalten.
Zur Definition von Kolloiden siehe Hunnius, Pharmazeu-
tisches Wörterbuch, 6. Auflage, Berlin, de Gruyter 1986,
S. 589 f., wobei im vorliegenden Text auch grobdisperse
Systeme mit Teilchengrößen bis 10 µm unter dem Begriff
30 kolloidale Systeme gefaßt werden.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß sich kolloidale,
farbstoffbeladene Systeme im Bereich von lokalen Entzün-
dungen oder Tumoren anreichern. Diese Anreicherung ist
35 für die Darstellung der Tumoren oder Entzündungen mit
Hilfe der NIR-Diagnostik hervorragend geeignet.

Überraschenderweise wurde ferner gefunden, daß die erfindungsgemäßen Kontrastmittel von bestimmten Zellen, beispielsweise von Kupferzellen der Leber, rasch abgebaut werden, was zu einer schnellen Abnahme der Kolloidkonzentrationen im Blut führt, während die Kolloidteilchen, welche bereits vom Zielgewebe aufgenommen wurden, wesentlich langsamer abgebaut werden. Dadurch wird das blutspiegelbedingte Grundrauschen stark reduziert, was die Darstellungen der Läsionen verbessert und/oder zu einem früheren Zeitpunkt möglich macht.

Die Erfindung betrifft somit farbstoffbeladene kolloidale Systeme, enthaltend kolloidale Teilchen einer Teilchengröße zwischen 5 nm - 10 µm, in oder an deren Wände und/oder Hohlräume Farbstoffmoleküle integriert, adhe-riert bzw. eingeschlossen sind.

Geeignet sind Systeme, bei denen die Farbstoffe in kolloidale Teilchen integriert sind, die aus bioabbaubarem partialsynthetischem oder naturidentischem Material bestehen. Die Eigenschaften und Methoden zur Darstellung geeigneter kolloidaler Teilchen sind z. B. in J. B. Boyett, C. W. Davis, Injectable Emulsions and Suspensions, in: H. A. Liebermann, M. M. Rieger, G. S. Banker (eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems Vol. 2; Marcel Dekker, New York, 1988, p. 379 - 416, beschrieben.

Besonders geeignet sind Systeme, bei denen das synthetische, polymere Material aus der nachfolgenden Gruppe ausgewählt ist: Poly-ε-caprolacton, Polymilchsäure, Polyglycolsäure, sowie Copolymere aus Polymilchsäure und Polyglycolsäure, Polyhydroxybuttersäure, Polyhydroxyvaleriansäure, sowie Copolymere aus Polyhydroxybuttersäure und Polyhydroxyvaleriansäure, Polyaminosäuren, Polyal-

kylcyanoacrylate, Polyamide, Polyacryldextran, Polyacryl-
stärke, Polyacrylsaccharid, Polyacrylamid, Polyester,
Poly(ortho)ester, Polyphosphorene, Copolymere aus Milch-
säure und/oder Glykolsäure mit Polyoxyethylen. Als natür-
liche oder partialsynthetische biologisch abbaubare
5 polymere Materialien werden insbesondere Proteine wie
Albumine, Collagen, Gelatine, Hämoglobin oder Fibrinogen
sowie Stärken, Dextrane, Chitin und Chitosan bevorzugt.

10 Besonders geeignet sind auch amphiphile Substanzen, die
entweder den Fluoreszenzfarbstoff in kolloidalen Teilchen
einschließen oder zusammen mit dem Fluoreszenzfarbstoff
kolloidale Teilchen bilden. Bevorzugt sind hier Phospho-
lipide, Fettsäuren, Fettalkohole, Cholesterol, Ester oder
15 Ether aus Fettalkoholen oder Fettalkoholen und Fettsäu-
ren, Zuckerderivate mit Fettsäuren oder Polyoxyethylen,
Ester oder Ether von Phospholipiden, Fettsäuren, Fettal-
koholen mit Polyoxyethylen, Gallensäuren, Derivate des
Sorbitans mit Polyoxyethylen oder Fettsäuren oder Fettal-
20 koholen sowie deren Kombinationen.

Bevorzugte erfindungsgemäße Kontrastmittel enthalten
Kolloide aus Proteinen, wie Albumine, Collagen, Gelatine,
Hämoglobin oder Fibrinogen, oder Stärken und Stärke-
25 derivaten, Dextranen, Chitin oder Chitosan.

Weiterhin bevorzugte erfindungsgemäße Kontrastmittel
enthalten Kolloide aus Phospholipiden, Fettsäuren, Fett-
alkoholen, Cholesterol, Estern aus Fettalkoholen und
30 Fettsäuren, Ether aus Fettalkoholen, Zuckerderivaten mit
Fettsäuren oder Polyoxyethylen, Estern oder Ether von
Phospholipiden, Fettsäuren oder Fettalkoholen mit Poly-
oxyethylen, Gallensäuren, Derivaten des Sorbitans mit
Polyoxyethylen, Fettsäuren oder Fettalkoholen sowie
35 Kombinationen der genannten Stoffe.

Insbesondere bevorzugt sind solche erfindungsgemäßen Kontrastmittel, welche Polyester von α -, β -, γ - oder ϵ -Hydroxycarbonsäuren, Polyalkylcyanoacrylate, Polyamino-säuren, Polyamide, polyacrylierte Saccharide oder
5 Poly(ortho)ester als Kolloide enthalten.

Die für das erfindungsgemäße kolloidale Nahinfrarotdiagnostikum verwendeten Farbstoffe zeichnen sich dadurch aus, daß sie im Wellenlängenbereich von 600 bis 1200 nm
10 absorbieren und fluoreszieren, Absorptionskoeffizienten von ca. 100 000 l mol⁻¹ cm⁻¹ und höher und, soweit Fluoreszenz erwünscht ist, Fluoreszenzquantenausbeuten größer 5% aufweisen.

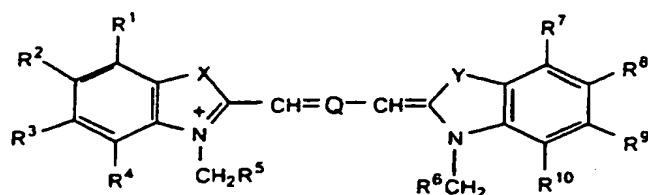
15 Die verwendeten Farbstoffe gehören zur Klasse der Polymethinfarbstoffe und sind aus folgender Gruppe ausgewählt: Cyanin-, Styryl-, Merocyanin-, Squarain-, Oxonolfarbstoffe.

20 Bevorzugt sind Farbstoffe aus der Klasse der Cyaninfarbstoffe mit Absorptions- und Fluoreszenzmaxima zwischen 700 und 1000 nm und Extinktionskoeffizienten von ca. 140 000 l mol⁻¹ cm⁻¹ und mehr, die einen oder mehrere unsubstituierte und/oder Sauerstoff-, Schwefel-, Stickstoff
25 enthaltende, verzweigte oder unverzweigte, acyklische oder zyklische, gegebenenfalls aromatische Kohlenstoffwasserstoffreste tragen.

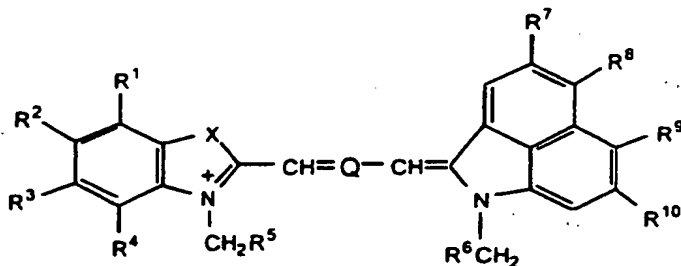
Die erfindungsgemäßen Kontrastmittel enthalten als Farbstoff einen Cyanin-, einen Styryl-, einen Merocyanin-,
30 einen Squarain-, einen Oxonolfarbstoff oder ein Gemisch aus den genannten Farbstoffen.

Bevorzugt sind erfindungsgemäße Kontrastmittel, welche
35 einen Farbstoff aus der Klasse der Cyaninfarbstoffe oder Squarainfarbstoffe enthalten.

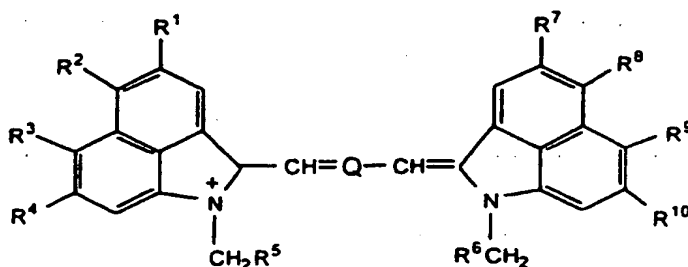
- Bevorzugt sind ferner erfindungsgemäße Kontrastmittel, bei denen der Farbstoff mit einem oder mehreren unverzweigten, verzweigten, cyclischen oder polycyclischen
- 5 Alkyl-, Alkenyl-, Polyalkenyl-, Alkinyl-, Polyalkinyl-, Aryl-, Alkylaryl- oder Arylalkyl-Resten mit jeweils bis zu 60 Kohlenstoffatomen, welche gegebenenfalls mit Halogenatomen, Hydroxy-, Carboxy-, Aminocarbonyl-, Alkoxy-
- 10 carbonyl-, Amino-, Aldehyd-, Oxo-, Oxy- oder Alkoxy-Gruppen mit bis zu 20 Kohlenstoffatomen substituiert sind und/oder gegebenenfalls durch ein oder mehrere Heteroatome aus der Reihe O, N, S oder P unterbrochen und/oder substituiert sind, substituiert ist.
- 15 Besonders bevorzugt sind erfindungsgemäße Kontrastmittel, bei denen mindestens ein Farbstoff der allgemeinen Formel I, II oder III



20



II



III

worin

5 R¹, R², R³, R⁴, R⁷, R⁸, R⁹ und R¹⁰ gleich oder unterschiedlich sind und unabhängig voneinander für einen Rest -COOE¹, -CONE¹E², -NHCOE¹, -NHCONHE¹, -NE¹E², -OE¹, -SO₃E¹, -SO₂E¹, -SO₂NE¹E², -E¹, für ein Fluor-, Chlor-, Brom- oder Iodatome oder eine Nitrogruppe stehen, oder wobei an jeweils zwei einander benachbarten
10 Resten R¹, R², R³ oder R⁴ bzw. R⁷, R⁸, R⁹ oder R¹⁰ unter Berücksichtigung der dazwischen liegenden C-Atome 5- bis 6-gliedrige Ringe anneliert sind, welche gesättigt, ungesättigt oder aromatisch sind und gegebenenfalls mit den Resten -COOE¹, -CONE¹E², -NHCOE¹,
15 -NHCONHE¹, -NE¹E², -OE¹, -SO₃E¹, -SO₂E¹, -SO₂NE¹E² substituiert sind,

worin

20 E¹ und E² gleich oder verschieden sind und unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder unverzweigte C₁-C₅₀-Alkyl-Kette, wobei die Kette oder Teile dieser Kette gegebenenfalls eine cyclische C₅-C₆- oder eine bicyklische C₁₀-Einheit
25 formen, stehen, welche durch Sauerstoffatome, Schwefelatome, Stickstoffatome, Carbonsäureester-, Carbonsäureamid-, Harnstoff-, Thioharnstoff-, Carbamat-Ether-Gruppierungen unterbrochen und/oder substituiert sind,
30 oder für eine Hydroxypolyoxyethylen- oder Methoxypolyoxyethylenkette oder für eine verzweigte oder unverzweigte C₁-C₁₀-Alkylkette, die durch 1 bis 19 Fluoratome substituiert ist, stehen,

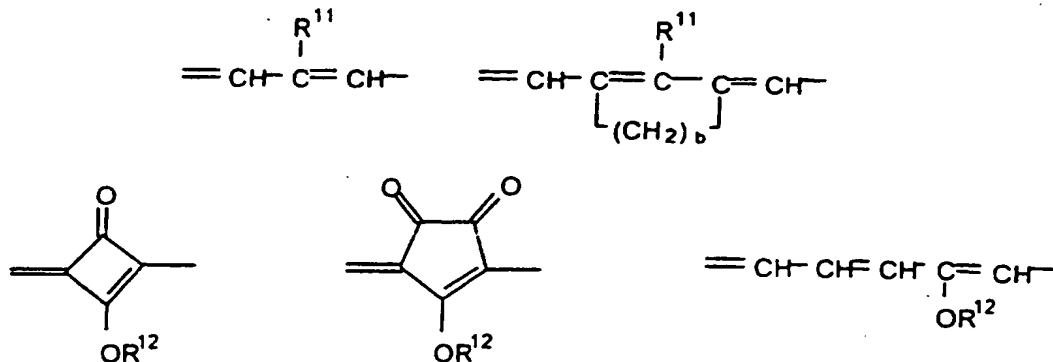
35

R⁵ und R⁶ unabhängig voneinander für einen Rest -E¹ oder für eine C₁-C₄-Sulfoalkylkette stehen,

wobei E¹ die oben angegebene Bedeutung hat

5

Q für ein Fragment



10

worin

R¹¹ ein Wasserstoff-, Fluor-, Chlor-, Brom- oder Iodat, einen Rest -NE¹E², -OE¹ oder -E¹ oder eine Nitrogruppe bedeutet,

15

R¹² für ein Wasserstoffatom oder einen Rest -E¹ steht,

b für die Zahl 0, 2 oder 3 steht,

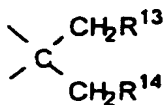
20

wobei E¹ und E² die oben angegebene Bedeutung haben,

steht,

25

X und Y gleich oder unterschiedlich sind und unabhängig voneinander für O, S, -CH=CH- oder ein Fragment



stehen,

worin

R¹³ und R¹⁴ unabhängig voneinander für Wasserstoff, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder unverzweigte C₁-C₁₅-Alkylkette, wobei gegebenenfalls die Reste R¹³ und R¹⁴ unter Ausbildung eines 5- oder 6-gliedrigen Ringes miteinander verknüpft sind, stehen, welche gegebenenfalls durch Sauerstoffatome und/oder durch Hydroxygruppen, Alkoxygruppen mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, Carbonsäureester- und/oder Carbonsäureamideinheiten unterbrochen und/oder substituiert sind,

oder deren Carbonsäure- und/oder Sulfonsäure-Salze mit physiologisch verträglichen anorganischen oder organischen Kationen

enthalten ist.

20

Kationen können Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium, Gadolinium, sowie Lysin, Glutamin und Methylglutamin sein.

25 Farbstoffe mit positiver Gesamtladung liegen bevorzugt als Iodide, Bromide oder Perchlorate vor.

Die erfindungsgemäßen Kontrastmittel können ferner mindestens zwei Farbstoffe enthalten, welche unterschiedliche photophysikalische und/oder pharmakologische Eigenschaften aufweisen.

Die erfindungsgemäßen Kontrastmittel können zusätzlich in der Galenik übliche Hilfs- und Trägerstoffe sowie Verdünnungsmittel enthalten.

35

Die Darstellung der Farbstoffe erfolgt nach literaturbe-
kannten Verfahren, wie beispielsweise Hamer, F. M., The
Cyanine Dyes and Related Compounds, John Wiley and Sons,
New York, 1964; Bioconjugate Chem. 4 (1993) 105-11; Anal.
5 Biochem. 217 (1994) 197-204; Tetrahedron 45 (1989) 4845-
66; Anal. Chim. Acta 282 (1993) 633-641; Dyes Pigm. 21
(1993) 227-234; EP 0 591 820 A1.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist
10 die Verwendung der erfindungsgemäßen Kontrastmittel für
die In-vivo Fluoreszenz- und Absorptionsdiagnostik im
Nahinfrarotbereich.

Die In-vivo-Diagnose unter Verwendung der erfindungsgemä-
15 ßen Kontrastmittel erfolgt bevorzugt nach intravenöser
Gabe der Substanzen durch Einstrahlung von monochromati-
schen Licht aus dem Wellenlängenbereich von 600 bis 1200
nm und der ortsabhängigen Detektion der nicht absorbier-
ten Strahlung und/oder der Fluoreszenzstrahlung. Aus den
20 erhaltenen Daten wird ein synthetisches Bild erzeugt.

Die Darstellung des erfindungsgemäßen Diagnostikums
erfolgt in Anlehnung an die in der Literaturbeschriebenen
Methoden zur Darstellung kolloidaler Teilchen, wobei den
25 Reaktionsgemischen ein oder mehrere Farbstoffe zugesetzt
werden. Durch die Wahl der Farbstoffkonzentration im
Reaktionssystem kann der Beladungsgrad variiert werden.

Bevorzugt werden die oben beschriebenen organischen
30 Materialien zusammen mit einem oder mehreren Farbstoffen
in einem oder mehreren mit Wasser nicht mischbaren,
organischen Lösungsmitteln gelöst und anschließend gege-
benenfalls nach Zusatz eines weiteren Lösungsmittels in
Wasser emulgiert, wobei der Emulsion gegebenenfalls ein
35 Emulgator zugesetzt werden kann. Das erhaltene kolloidale
System kann anschließend filtriert und gegebenenfalls

durch Trocknungsmaßnahmen, wie z. B. Gefriertrocknung, stabilisiert werden.

5 Diese Kontrastmittel werden nach dem Fachmann bekannten Methoden hergestellt, gegebenenfalls unter Verwendung üblicher Hilfs- und/oder Trägerstoffe sowie Verdünnungs-
mitteln und dergleichen. Dazu gehören physiologisch
verträgliche Elektrolyte, Puffer, Detergentien, Emulgato-
ren und Substanzen zur Anpassung der Osmolalität sowie
10 zur Verbesserung der Stabilität und Löslichkeit, wie beispielsweise Cyclodextrine. Durch die in der Pharmazie gebräuchlichen Maßnahmen ist für die Sterilität der Zubereitungen bei der Herstellung und insbesondere vor der Applikation zu sorgen.

15

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1:

20 **Herstellung einer 1,1',3,3,3',3'-Hexamethylindotricarbo-
cyaniniodid enthaltenden partikulären Suspension**

7,6 mg Hexamethylindotricarbocyaniniodid und 0,2 g eines
Copolymeren aus Milchsäure und Glykolsäure mit einer
25 Molmasse von ca. 15000 g/mol werden in 2,5 ml Methylen-
chlorid gelöst. Die Lösung wird unter heftigem Rühren in
20 ml einer zuvor 15 Minuten bei 121°C autoklavierten
2 %igen Lösung von Gelatine gegeben. Es wird 45 Minuten
lang weitergerührt. Die entstandene Suspension wird in
30 Portionen à 5 ml in 20 ml fassende Glasgefäße abgefüllt
und direkt mit flüssigem Stickstoff eingefroren. An-
schließend wird die gefrorenen Suspension gefrieretrock-
net. Nach Resuspendieren einer Portion mit 5 ml 0,9 %iger
Kochsalzlösung enthält die Suspension ca. 10^{10}
35 Hexamethylindotricarbocyaniniodid enthaltende Teilchen
pro ml mit einer Partikelgröße von ca. 1 bis 10 µm.

Beispiel 2:

5 Anwendung der Präparation aus Beispiel 1

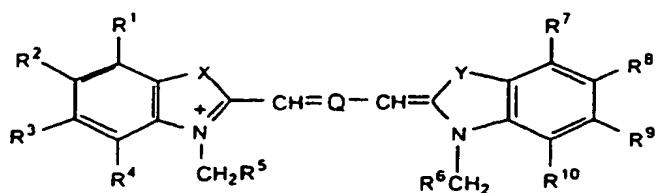
Die nach Applikation von 200 μ l einer Poly-(L-Lactid-glycolid)-Partikel-Suspension (10^{10} Teilchen /ml) mit verkapseltem Hexamethylindotricarbocyaninioid (0.6μ mol/ml) durchgeführte Fluoreszenzlichtaufnahme einer Nacktmaus mit LS174T-Tumor mit einer CCD-Kamera zu Bildern, bei welchen nach 24 h die Fluoreszenz hauptsächlich im Tumorgewebe nachweisbar war (Figur 1).

Patentansprüche

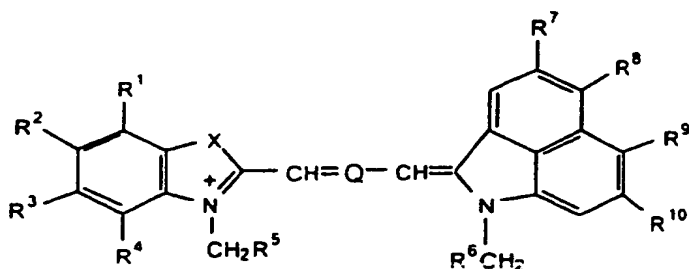
- 5 1. Kontrastmittel für die Nahinfrarot-Diagnostik
enthaltend kolloidale, farbstoffbeladene Systeme,
dadurch gekennzeichnet, daß die Kolloidpartikel eine
Größe von 5 nm bis 10 µm aufweisen und mindestens ein
im Wellenlängenbereich von 600 bis 1200 nm
10 absorbierender und/oder fluoreszierender Farbstoff
enthalten ist.
- 15 2. Kontrastmittel nach Anspruch 1, dadurch gekenn-
zeichnet, daß die Kolloide Polyester von α -, β -, γ -
oder ϵ -Hydroxycarbonsäuren, Polyalkylcyanoacrylate,
Polyaminosäuren, Polyamide, polyacrylierte Saccharide
oder Poly(ortho)ester enthalten.
- 20 3. Kontrastmittel nach Anspruch 1, dadurch
gekennzeichnet, daß die Kolloide Proteine, wie
Albumine, Collagen, Gelatine, Hämoglobin oder
Fibrinogen, oder Stärken, Dextrane, Chitin oder
25 Chitosan enthalten.
- 30 4. Kontrastmittel nach Anspruch 1, dadurch
gekennzeichnet, daß die Kolloide Phospholipide,
Fettsäuren, Fettalkohole, Cholesterol, Ester aus
Fettalkoholen und Fettsäuren, Ether aus
Fettalkoholen, Zuckerderivate mit Fettsäuren oder
Polyoxyethylen, Ester oder Ether von Phospholipiden,
Fettsäuren oder Fettalkoholen mit Polyoxyethylen,
35 Gallensäuren, Derivate des Sorbitans mit

Polyoxyethylen, Fettsäuren oder Fettalkoholen sowie Kombinationen der genannten Stoffe enthalten.

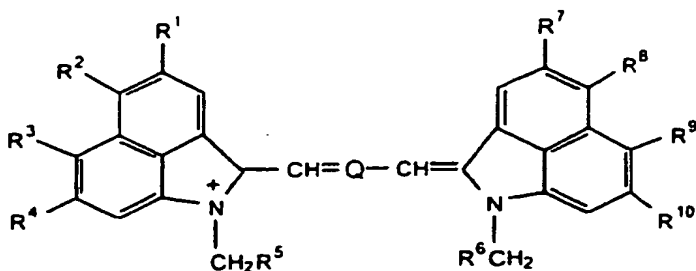
- 5 5. Kontrastmittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß als Farbstoff ein Cyanin-, ein Styryl-, ein Merocyanin-, ein Squarain-, ein Oxonolfarbstoff oder ein Gemisch aus den genannten Farbstoffen enthalten ist.
- 10
6. Kontrastmittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Farbstoff aus der Klasse der Cyaninfarbstoffe oder
- 15 Squarainfarbstoffe enthalten ist.
7. Kontrastmittel nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff mit einem oder
- 20 mehreren unverzweigten, verzweigten, cyclischen oder polycyclischen Alkyl-, Alkenyl-, Polyalkenyl-, Alkinyl-, Polyalkinyl-, Aryl-, Alkylaryl- oder Arylalkyl-Resten mit jeweils bis zu 60 Kohlenstoffatomen, welche gegebenenfalls mit
- 25 Halogenatomen, Hydroxy-, Carboxy-, Aminocarbonyl-, Alkoxy-carbonyl-, Amino-, Aldehyd-, Oxo-, Oxy- oder Alkoxy-Gruppen mit bis zu 20 Kohlenstoffatomen substituiert sind und/oder gegebenenfalls durch ein oder mehrere Heteroatome aus der Reihe O, N, S oder P
- 30 unterbrochen und/oder substituiert sind, substituiert ist.
8. Kontrastmittel nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Farbstoff der
- 35 allgemeinen Formel I, II oder III



I



II



III

5

worin

10

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^7 , R^8 , R^9 und R^{10} gleich oder unterschiedlich sind und unabhängig voneinander für einen Rest $-\text{COOE}^1$, $-\text{CONE}^1\text{E}^2$, $-\text{NHCOE}^1$, $-\text{NHCONHE}^1$, $-\text{NE}^1\text{E}^2$, $-\text{OE}^1$, $-\text{SO}_3\text{E}^1$, $-\text{SO}_2\text{E}^1$, $-\text{SO}_2\text{NE}^1\text{E}^2$, $-\text{E}^1$, für ein Fluor-, Chlor-, Brom- oder Iodatome oder eine Nitrogruppe stehen, oder wobei an jeweils zwei einander benachbarten Resten R^1 , R^2 , R^3 oder R^4 bzw. R^7 , R^8 , R^9 oder R^{10} unter Berücksichtigung der dazwischen liegenden C-Atome 5- bis 6-gliedrige Ringe anneliert sind, welche gesättigt, ungesättigt oder aromatisch sind und gegebenenfalls mit den Resten $-\text{COOE}^1$, $-\text{CONE}^1\text{E}^2$, $-\text{NHCOE}^1$, $-\text{NHCONHE}^1$,

20

-NE¹E², -OE¹, -SO₃E¹, -SO₂E¹, -SO₂NE¹E²
substituiert sind,

worin

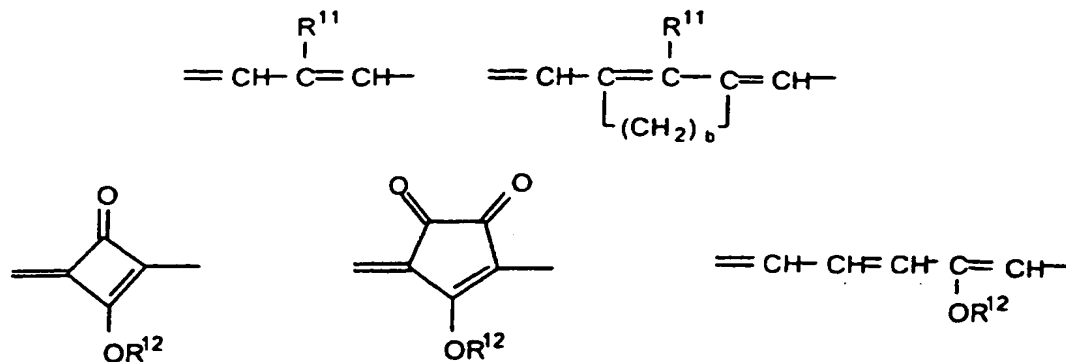
5 E¹ und E² gleich oder verschieden sind und
unabhängig voneinander für ein Wasserstoff-
atom, eine gesättigte oder ungesättigte,
verzweigte oder unverzweigte C₁-C₅₀-Alkyl-
Kette, wobei die Kette oder Teile dieser
10 Kette gegebenenfalls eine cyclische C₅-C₆-
oder eine bicyklische C₁₀-Einheit formen,
stehen, welche durch Sauerstoffatome,
Schwefelatome, Stickstoffatome,
Carbonsäureester-, Carbonsäureamid-,
15 Harnstoff-, Thioharnstoff-, Carbamat-, Ether-
Gruppierungen unterbrochen und/oder
substituiert sind,
oder für eine Hydroxypolyoxyethylen- oder
Methoxypolyoxyethylenkette oder für eine
20 verzweigte oder unverzweigte C₁-C₁₀-
Alkylkette, die durch 1 bis 19 Fluoratome
substituiert ist, stehen,

25 R⁵ und R⁶ unabhängig voneinander für einen Rest
-E¹ oder für eine C₁-C₄-Sulfoalkylkette stehen,

wobei E¹ die oben angegebene Bedeutung hat

Q für ein Fragment

30



worin

R¹¹ ein Wasserstoff-, Fluor-, Chlor-, Brom- oder Iodatome, einen Rest -NE¹E², -OE¹ oder -E¹ oder eine Nitrogruppe bedeutet,

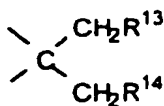
R¹² für ein Wasserstoffatom oder einen Rest -E¹ steht,

b für die Zahl 0, 2 oder 3 steht,

wobei E¹ und E² die oben angegebene Bedeutung haben,

steht,

X und Y gleich oder unterschiedlich sind und unabhängig voneinander für O, S, -CH=CH- oder ein Fragment



stehen,

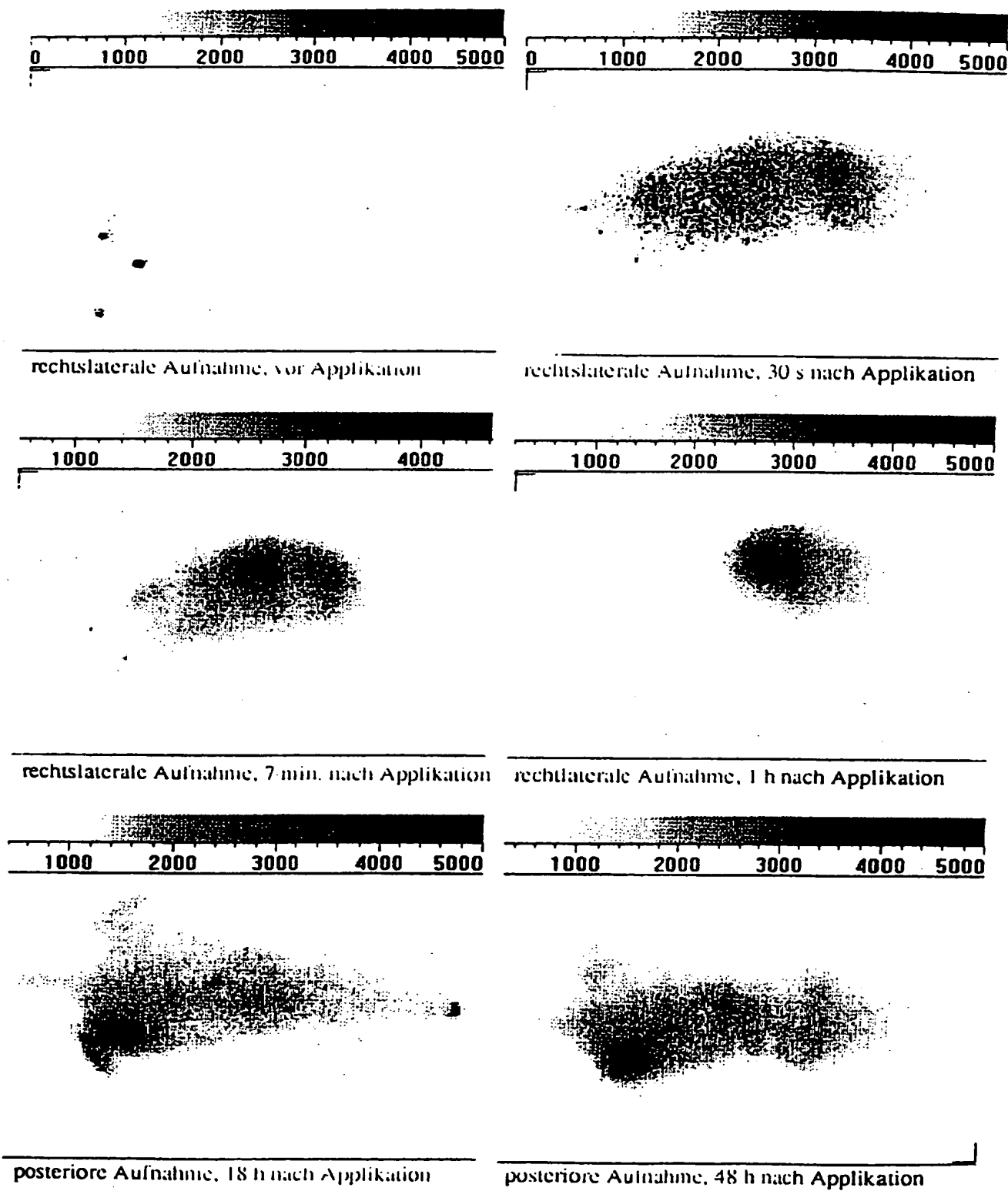
worin

R¹³ und R¹⁴ unabhängig voneinander für Wasserstoff, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder unverzweigte C₁-C₁₅-Alkylkette, wobei gegebenenfalls die

- 5 Reste R¹³ und R¹⁴ unter Ausbildung eines 5-
oder 6-gliedrigen Ringes miteinander
verknüpft sind, stehen, welche gegebenenfalls
durch Sauerstoffatome und/oder durch Hydroxy-
gruppen, Alkoxygruppen mit bis zu 6 Kohlen-
stoffatomen, Carbonsäureester- und/oder
Carbonsäureamideinheiten unterbrochen
und/oder substituiert sind,
- 10 oder deren Carbonsäure- und/oder Sulfonsäure-Salze
mit physiologisch verträglichen anorganischen oder
organischen Kationen
- 15 enthalten ist.
9. Kontrastmittel nach mindestens einem der Ansprüche 1
bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens zwei
Farbstoffe mit unterschiedlichen photophysikalischen
20 und/oder pharmakologischen Eigenschaften enthalten
sind.
10. Kontrastmittel nach mindestens einem der Ansprüche 1
25 bis 9, zusammen mit den in der Galenik üblichen
Hilfs- und Trägerstoffen sowie Verdünnungsmitteln.
11. Verwendung von Kontrastmitteln nach mindestens einem
30 der Ansprüche 1 bis 10 für die In-vivo Fluoreszenz-
und Absorptionsdiagnostik im Nahinfrarotbereich.

1/1

Figur 1



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

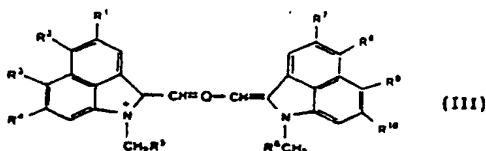
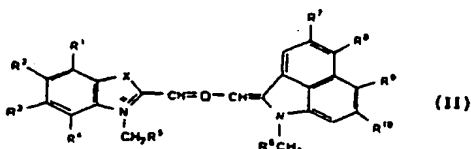
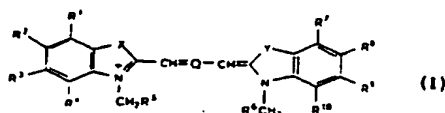


INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : A61K 49/00 // A61K 9/51		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/13490
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	17. April 1997 (17.04.97)
(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/DE96/01878		
(22) Internationales Anmeldedatum:	26. September 1996 (26.09.96)		
(30) Prioritätsdaten:	195 39 409.7 11. Oktober 1995 (11.10.95) DE		
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):	INSTITUT FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH AN DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN [DE/DE]; Spandauer Damm 130, D-14050 Berlin (DE).		
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):	LICHA, Kai [DE/DE]; Argentinische Allee 179, D-14169 Berlin (DE). RIEFKE, Björn [DE/DE]; Weverstrasse 51, D-13595 Berlin (DE). WEITSCHIESS, Werner [DE/DE]; Gneisenaustasse 65, D-10961 Berlin (DE). HELDMANN, Dieter [DE/DE]; Krefelderstrasse 3, D-10555 Berlin (DE). SUDMANN, Violetta [DE/DE]; Badstrasse 64, D-13357 Berlin (DE).		
(74) Anwalt:	WABLAT, Wolfgang; Potsdamer Chaussee 48, D-14129 Berlin (DE).		
(81) Bestimmungsstaaten:	AU, CA, CN, HU, JP, KR, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).		
Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.			
(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:		23. Oktober 1997 (23.10.97)	

(54) Title: CONTRASTING AGENTS FOR NEAR INFRARED DIAGNOSIS CONTAINING COLLOIDAL SYSTEMS LOADED WITH POLYMETHINE DYES

(54) Bezeichnung: KONTRASTMITTEL FÜR DIE NAHINFRAROT-DIAGNOSTIK, ENTHALTEND MIT POLYMETHINFARBSTOFFEN BELADENE KOLLOIDALE SYSTEME



(57) Abstract

Colloidal systems loaded with polymethine dyes having appropriate photophysical and pharmacological properties are disclosed, as well as their use as contrasting agents in fluorescence and transillumination diagnosis in the near infrared spectral range and a process for producing the same.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft mit Polymethinfarbstoffen beladene kolloidale Systeme mit geeigneten photophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften, deren Verwendung als Kontrastmittel in der Fluoreszenz- und Transilluminationsdiagnostik im nahinfraroten Spektralbereich sowie Verfahren zu ihrer Herstellung.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 In International Application No
 P 96/01878

 A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 A61K49/00 //A61K9/51

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 C09B A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 08772 A (BIOSITE DIAGNOSTICS INC) 30 March 1995	1-4
Y	see abstract see examples 10-15,18 ---	5-11
Y	EP 0 266 195 A (SMITHKLINE BECKMAN CORP) 4 May 1988 see abstract ---	1-11
Y	EP 0 266 196 A (SMITHKLINE BECKMAN CORP) 4 May 1988 see abstract see examples ---	1-11

	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *A* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 August 1997

Date of mailing of the international search report

21.08.97

Name and mailing address of the ISA

 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Dullaart, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

96/DE 96/01878

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>DYES AND PIGMENTS, vol. 17, no. 2, 1 January 1991, pages 153-162, XP000233082 GADJEV N I ET AL: "NEAR-INFRARED ABSORBING ASYMMETRIC TRIMETHINECYANINE DYES CONTAINING BENZ(C,D)INDOLIUM AND PYRYLIUM END GROUPS" see abstract see schemata 1-4 see tables</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-11
Y	<p>DYES AND PIGMENTS, vol. 14, no. 1, 1 January 1990, pages 73-77, XP000141184 N.I.GADJEV ET AL: "NEAR-INFRARED ABSORBING ASYMMETRICAL TRIMETHINECYANINE DYES" see abstract see schema 1</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-11
Y	<p>DYES AND PIGMENTS, vol. 12, no. 2, 1 January 1990, pages 157-162, XP000074777 DELIGEORGIEV T G ET AL: "NEAR-INFRARED ABSORBING PYRYLIUM TRIMETHINECYANINE DYES" see abstract see schemata 1 and 2 see tables</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-11
Y	<p>WO 92 07036 A (STERLING WINTHROP INC) 30 April 1992 see abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-11
Y	<p>J. ORG. CHEM. USSR (ENGL.TRANSL.), 1987, VOL. 23, NO. 10, PAGES 1850-1852, XP002037272 MAKIN, S. M. ET AL: "CHEMISTRY OF ENOL ETHERS. LXXIX. REACTION OF GLUTACONALDEHYDE ACETALS AND THEIR DERIVATIVES WITH HETEROCYCLIC COMPOUNDS. THE SYNTHESIS OF TRICARBOCYANINE DYES" see abstract see table 1 see abstract EXPERIMENTAL</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-11
Y	<p>CANCER IMMUNOLOGY IMMUNOTHERAPY, 1995, VOL. 41, NO. 4, PAGE(S) 257-263, XP002037273 BALLOU B. ET AL: "Tumor labeling in vivo using cyanine -conjugated monoclonal antibodies" see abstract see page 258 see paragraph discussion</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-11
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inventor's Application No
PCT/JP 96/01878

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>ENDOSCOPY, 1990, VOL. 22, NO. 5, PAGE(S) 217-220., XP002037274 KOHSO H ET AL: "AN INVESTIGATION OF AN IR RAY ELECTRONIC ENDOSCOPE WITH A LASER DIODE LIGHT SOURCE" see abstract see paragraph RESULTS</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-11
Y	<p>METHODS ENZYMOL., 1985, VOL. 112, PAGE(S) 436-448, XP002037275 KITCHELL J.P. ET AL: "Poly(lactic/glycolic acid) biodegradable drug-polymer matrix systems" see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-11
Y	<p>MAKROMOLEKULARE CHEMIE, RAPID COMMUNICATIONS, vol. 14, no. 7, 1 July 1993, pages 457-460, XP000369785 ZHENG-RONG SHEN ET AL: "SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF POLY(DL-LACTIC ACID/GLYCOLIC ACID)" see abstract see page 458</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-11
Y	<p>EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, vol. 41, no. 1, 1 January 1995, pages 31-37, XP000482889 SANCHEZ A ET AL: "POLY(D,6-LACTIDE-CO-GLYCOLIDE) MICRO AND NANOSPHERES AS A WAY TO PROLONG BLOOD-PLASMA LEVELS OF SUBCUTANEOUSLY INJECTED CYCLOSPORIN A" see abstract see paragraph 2.1 - paragraph 2.6 see tables 1-3</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-11
Y	<p>JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, vol. 25, no. 1 / 02, 27 May 1993, pages 145-153, XP000361376 SCHOLLES P D ET AL: "THE PREPARATION OF SUB-200 NM POLY(LACTIDE-CO-GLYCOLIDE) MICROSPHERES FOR SITE-SPECIFIC DRUG DELIVERY" see abstract see paragraph Results and Discussion</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 96/01878

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
O,P, X	PROC. SPIE-INT. SOC. OPT. ENG., 1996, VOL. 2927, NO: OPTICAL AND IMAGING TECHNIQUES FOR BIOMONITORING II, PAGES 199-208, XP002037276 RIEFKE, B. ET AL: "In vivo characterization of cyanine dyes as contrast agents for near-infrared imaging" see the whole document	1-11
P,X	US 5 494 793 A (SCHINDELE DEBORAH C ET AL) 27 February 1996 see abstract see examples 6,9	1-11
P,X	WO 96 17628 A (UNIV BERLIN INST DIAGNOSTIKFORSCHUNG) 13 June 1996 see examples	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 96/01878

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 1-11
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Due to the large number of compounds defined by the claims, the search was carried out for the basic concept of the application and the examples mentioned in the description.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 96/01878

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9508772 A	30-03-95	AU 8011294 A EP 0670041 A JP 8503994 T	10-04-95 06-09-95 30-04-96
EP 0266195 A	04-05-88	US 4762701 A AT 125710 T AU 607165 B AU 8040187 A CA 1294545 A DE 3751434 D DE 3751434 T ES 2076929 T IE 70749 B JP 63126833 A	09-08-88 15-08-95 28-02-91 05-05-88 21-01-92 07-09-95 15-05-96 16-11-95 30-12-96 30-05-88
EP 0266196 A	04-05-88	US 4859584 A AU 607944 B AU 8040287 A CA 1294544 A CN 1014276 B JP 63122955 A	22-08-89 21-03-91 05-05-88 21-01-92 09-10-91 26-05-88
WO 9207036 A	30-04-92	US 5208336 A AU 8905691 A	04-05-93 20-05-92
US 5494793 A	27-02-96	US 4803170 A US 5346670 A AU 642396 B AU 4216389 A CA 1337754 A EP 0434727 A JP 4500516 T WO 9002747 A US 5135717 A AU 636562 B AU 1056888 A DE 3788356 D DE 3788356 T EP 0335902 A WO 8804777 A	07-02-89 13-09-94 21-10-93 02-04-90 19-12-95 03-07-91 30-01-92 22-03-90 04-08-92 06-05-93 15-07-88 13-01-94 23-06-94 11-10-89 30-06-88

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In International Application No

PCT/DE 96/01878

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9617628 A	13-06-96	DE 4445065 A	13-06-96
		AU 3740995 A	26-06-96
		NO 972509 A	02-06-97
		ZA 9509707 A	29-05-96

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/01878

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K49/00 //A61K9/51

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C09B A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 08772 A (BIOSITE DIAGNOSTICS INC) 30.März 1995	1-4
Y	siehe Zusammenfassung siehe Beispiele 10-15,18 ---	5-11
Y	EP 0 266 195 A (SMITHKLINE BECKMAN CORP) 4.Mai 1988 siehe Zusammenfassung ---	1-11
Y	EP 0 266 196 A (SMITHKLINE BECKMAN CORP) 4.Mai 1988 siehe Zusammenfassung siehe Beispiele ---	1-11

	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- * "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- * "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- * "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- * "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- * "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

* "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

* "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

* "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

* "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8.August 1997

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

21.08.97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Dullaart, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In Aktenzeichen
PCT/DE 96/01878

C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	DYES AND PIGMENTS, Bd. 17, Nr. 2, 1. Januar 1991, Seiten 153-162, XP000233082 GADJEV N I ET AL: "NEAR-INFRARED ABSORBING ASYMMETRIC TRIMETHINECYANINE DYES CONTAINING BENZ(C,D)INDOLIUM AND PYRYLIUM END GROUPS" siehe Zusammenfassung siehe Schemes 1-4 siehe Tabellen ---	1-11
Y	DYES AND PIGMENTS, Bd. 14, Nr. 1, 1. Januar 1990, Seiten 73-77, XP000141184 N.I.GADJEV ET AL: "NEAR-INFRARED ABSORBING ASYMMETRICAL TRIMETHINECYANINE DYES" siehe Zusammenfassung siehe Scheme 1 ---	1-11
Y	DYES AND PIGMENTS, Bd. 12, Nr. 2, 1. Januar 1990, Seiten 157-162, XP000074777 DELIGEORGIEV T G ET AL: "NEAR-INFRARED ABSORBING PYRYLIUM TRIMETHINECYANINE DYES" siehe Zusammenfassung siehe Schemes 1 und 2 siehe Tabellen ---	1-11
Y	WO 92 07036 A (STERLING WINTHROP INC) 30. April 1992 siehe Zusammenfassung ---	1-11
Y	J. ORG. CHEM. USSR (ENGL. TRANSL.), 1987, VOL. 23, NO. 10, PAGES 1850-1852, XP002037272 MAKIN, S. M. ET AL: "CHEMISTRY OF ENOL ETHERS. LXXIX. REACTION OF GLUTACONALDEHYDE ACETALS AND THEIR DERIVATIVES WITH HETEROCYCLIC COMPOUNDS. THE SYNTHESIS OF TRICARBOCYANINE DYES" siehe Zusammenfassung siehe Tabelle 1 Siehe absatz EXPERIMENTAL ---	1-11
Y	CANCER IMMUNOLOGY IMMUNOTHERAPY, 1995, VOL. 41, NO. 4, PAGE(S) 257-263, XP002037273 BALLOU B. ET AL: "Tumor labeling in vivo using cyanine -conjugated monoclonal antibodies" siehe Zusammenfassung siehe Seite 258 siehe Absatz Discussion ---	1-11

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	ENDOSCOPY, 1990, VOL. 22, NO. 5, PAGE(S) 217-220., XP002037274 KOHSD H ET AL: "AN INVESTIGATION OF AN IR RAY ELECTRONIC ENDOSCOPE WITH A LASER DIODE LIGHT SOURCE" siehe Zusammenfassung siehe Absatz RESULTS ---	1-11
Y	METHODS ENZYMOL., 1985, VOL. 112, PAGE(S) 436-448, XP002037275 KITCHELL J.P. ET AL: "Poly(lactic/glycolic acid) biodegradable drug-polymer matrix systems" siehe das ganze Dokument ---	1-11
Y	MAKROMOLEKULARE CHEMIE, RAPID COMMUNICATIONS, Bd. 14, Nr. 7, 1.Juli 1993, Seiten 457-460, XP000369785 ZHENG-RONG SHEN ET AL: "SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF POLY(DL-LACTIC ACID/GLYCOLIC ACID)" siehe Zusammenfassung siehe Seite 458 ---	1-11
Y	EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, Bd. 41, Nr. 1, 1.Januar 1995, Seiten 31-37, XP000482889 SANCHEZ A ET AL: "POLY(D,6-LACTIDE-CO-GLYCOLIDE) MICRO AND NANOSPHERES AS A WAY TO PROLONG BLOOD-PLASMA LEVELS OF SUBCUTANEOUSLY INJECTED CYCLOSPORIN A" siehe Zusammenfassung siehe Absatz 2.1 - Absatz 2.6 siehe Tabellen 1-3 ---	1-11
Y	JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, Bd. 25, Nr. 1 / 02, 27.Mai 1993, Seiten 145-153, XP000361376 SCHOLES P D ET AL: "THE PREPARATION OF SUB-200 NM POLY(LACTIDE-CO-GLYCOLIDE) MICROSPHERES FOR SITE-SPECIFIC DRUG DELIVERY" siehe Zusammenfassung siehe Absatz Results and Discussion ---	1-11
	---	-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In Aktenzeichen
PCT/ISA 96/01878

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
O,P, X	PROC. SPIE-INT. SOC. OPT. ENG., 1996, VOL. 2927, NO: OPTICAL AND IMAGING TECHNIQUES FOR BIOMONITORING II, PAGES 199-208, XP002037276 RIEFKE, B. ET AL: "In vivo characterization of cyanine dyes as contrast agents for near-infrared imaging" siehe das ganze Dokument ---	1-11
P,X	US 5 494 793 A (SCHINDELE DEBORAH C ET AL) 27.Februar 1996 siehe Zusammenfassung siehe Beispiele 6,9 ---	1-11
P,X	WO 96 17628 A (UNIV BERLIN INST DIAGNOSTIKFORSCHUNG) 13.Juni 1996 siehe Beispiele -----	1-11

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt I auf Blatt I)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. 1-11 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
Wegen der großen Zahl der durch den Anspruchswortlaut definierten Verbindungen wurde die Recherche für den Grundgedanken der Anmeldung und die in der Beschreibung erwähnten Beispiele durchgeführt.
3. ☐ Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen enthalten:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die derselben Patentfamilie gehören

In Aktenzeichen

PCT/DE 96/01878

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9508772 A	30-03-95	AU 8011294 A EP 0670041 A JP 8503994 T	10-04-95 06-09-95 30-04-96
EP 0266195 A	04-05-88	US 4762701 A AT 125710 T AU 607165 B AU 8040187 A CA 1294545 A DE 3751434 D DE 3751434 T ES 2076929 T IE 70749 B JP 63126833 A	09-08-88 15-08-95 28-02-91 05-05-88 21-01-92 07-09-95 15-05-96 16-11-95 30-12-96 30-05-88
EP 0266196 A	04-05-88	US 4859584 A AU 607944 B AU 8040287 A CA 1294544 A CN 1014276 B JP 63122955 A	22-08-89 21-03-91 05-05-88 21-01-92 09-10-91 26-05-88
WO 9207036 A	30-04-92	US 5208336 A AU 8905691 A	04-05-93 20-05-92
US 5494793 A	27-02-96	US 4803170 A US 5346670 A AU 642396 B AU 4216389 A CA 1337754 A EP 0434727 A JP 4500516 T WO 9002747 A US 5135717 A AU 636562 B AU 1056888 A DE 3788356 D DE 3788356 T EP 0335902 A WO 8804777 A	07-02-89 13-09-94 21-10-93 02-04-90 19-12-95 03-07-91 30-01-92 22-03-90 04-08-92 06-05-93 15-07-88 13-01-94 23-06-94 11-10-89 30-06-88

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/01878

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9617628 A	13-06-96	DE 4445065 A	13-06-96
		AU 3740995 A	26-06-96
		NO 972509 A	02-06-97
		ZA 9509707 A	29-05-96
